R. UNIVERSITÀ DI PISA

ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
R. OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

184

O. VERONA e E. BALDACCI

ISOLAMENTO DI SCHIZOMICETI CELLULOSITICI *(CYTOPHAGA)*, ATTINOMICETI *(ACTINOMYCES)*, EUMICETI DALL'INTESTINO DELLE TERMITI, E RICERCHE SULLA ATTIVITÀ CELLULOSITICA DEGLI ATTINOMICETI

Estratto dagli *Atti dell'Istituto Botanico dell'Università di Pavia*
Serie IV, Vol. XI — 1939 — (Anno XVII)
e da *Mycopathologia*, Vol. II, fasc. 2°, 1939

SEPARATUM

Vol. II 30. VII. 1939 Fasc. 2

MYCOPATHOLOGIA

EDITORES:

R. CIFERRI et P. REDAELLI

Firenze Pavia

COLLABORATORES:

F. de Almeida, Saõ Paulo — A. E. de Arêa Leão, Rio de Janeiro — R. Arima, Osaka — A. Azzi, Torino — I. Ballagi, Budapest — T. Benedek, Chicago — R. W. Benham, New York — K. B. Boedijn, Buitenzorg — A. Buschke, Berlin — A. Carini, Saõ Paulo — A. L. Carrión, San Juan de Porto Rico — A. Castellani, Roma — A. Catanei, Alger — N. F. Conant, Durham, N. C. — J. N. Couch, Chapel Hill, N. C. — C. W. Dodge, St. Louis, Mo. — C. W. Emmons, Washington, D. C. — G. Enderlein, Berlin — W. Engelhardt, Tübingen — G. Falchi, Pavia — O. da Fonseca, Rio de Janeiro — I. Froilano de Mello, Nova Goa (Indes Portugaises) — J. A. Gammel, Cleveland, Ohio — H. Gougerot Paris — L. Grigoraki, Marseille — A. Guillermond, Paris — F. C. Harrison, Montreal — A. T. Henrici, Minneapolis, Minn. — I. G. Hopkins, New York — R. St. John-Brooks, London — T. Kambayashi, Tokyo — J. E. McKinnon, Montevideo — O. de Magalhães Bello Horizonte — A. v. Mallinkrodt-Haupt, Köln — D. S. Martin, Durham, N.C. — S. Milochevitch, Beograd — M. Moore, St. Louis, Mo. — J. A. Nannfeldt, Upsala — P. Negroni, Buenos Aires — F. L. Niño, Buenos Aires — M. Ota, Tokyo — Pereira-Filho, Porto Alegre — A. Pijper, Pretoria — G. Pollacci, Pavia — V. Puntoni, Roma — E. Rixford(†), San Francisco, Calif. — H. da Rocha Lima, Saõ Paulo — A. Sartory, Strasbourg — R. Sartory, Strasbourg — F. J. Seaver, New York — R. V. Talice, Montevideo — F. W. Tanner, Urbana, Ill. — A. C. Ukil, Calcutta — I. Ch. Verbunt, Batavia — O. Verona, Pisa — F. D. Weidmann, Philadelphia Pa. — J. Westerdijk, Baarn.

Dr. W. JUNK — UITGEVERIJ — DEN HAAG — 1939

CONTENTS: TABLE DES MATIÈRES: CONTENUTO: INHALT:

Pag.

R. Ciferri and **P. Redaelli:** *Mycotorula* vs. *Candida*: a plea. (From the Botanical Inst. Agric. Faculty, R. Univ. of Florenz and from the Inst. of Pathol. Anat., R. Univ. of Pavia) 73

G. B. Cottini: Un caso di „lingua nigra et pilosa" con isolamento di *Mycotorula Guilliermondi* (Cast.) n. comb. (con la tavola XII). (Dalla Clin. Dermatologica, R. Univ. di Catania) 75

O. Verona e **O. Malaguzzi-Valeri:** *Oidium albicans* Robin [*Mycotorula albicans* (Rob.) Lang. et Tal.] e *Monilia pseudotropicalis* Castellani [*Mycocandida pseudotropicalis* (Cast.) Cif. et Red.] (con una fig.). (Dall'Istit. di Patol. Veget. e Microb. Agrar. e dall'Istit. Clin. Pediatrica, R. Univ. di Pisa) 80

E. Baldacci: Introduzione allo studio degli Attinomiceti. (con le tavole XIII—XV). (Dal Laboratorio Crittogamico Ital. di Pavia) 84

W. H. Silbergleit e **P. Redaelli:** Colite algina da *Oscillatoria enterica* n. sp. ad interim, in una scimmia (*Cinocephalus amadriadis*) (con le tav. XVI e XVII). (Dall'Istit. di Anat. Patol., R. Univ. di Pavia) 107

P. Redaelli, R. Ciferri e **C. Cavallero:** Sul presunto *Endomyces albicans* Vuill. (con le tavole XVIII—XIX). (Dall'Istit. di Anat. Patol., R. Univ. di Pavia e dall'Istit. Bot., Facoltà Agraria, R. Univ. di Firenze) 116

O. Verona: A proposito della unificazione dei generi delle „Torulopsidaceae-Mycotoruleae". (Dall'Istit. di Microbiol. Agrar., R. Univ. di Firenze) 122

I. Froilano de Mello et **L. A. Fernandes:** Onychomycose du medius et annulaire dûe à une levure du genre *Torulopsis* Berlese 1894. (Escola Medico-cirurgica de Nova Goa) . 124

J. E. Mackinnon: *Aspergillus terreus* Thom, parásito del hombre (con una figura). (Instit. de Hig. Exper., Sec. de Parasit., Montevideo) 127

O. Verona e **E. Baldacci:** Isolamento di schizomiceti cellulositici, attinomiceti, eumiceti dall'intestino delle termiti e ricerche sulla attività cellulositica degli attinomiceti (con la tavola XX). (Dall'Istit. di Microbiol. R. Univ. di Pisa e dal Labor. Crittogamico Ital. di Pavia) 130

Bibliographia mycopathologica II (1938) 138

TABLE DES MATIÈRES DES FASCICULES SUIVANTS: CONTENUTO DEI FASCICOLI SEGUENTI CONTENTS OF THE FOLLOWING PARTS: AUS DEM INHALT DER NÄCHSTEN HEFTE:

E. Baldacci: Revisione delle specie: *Actinomyces albus, A. chromogenes, A. odorifer, A. thermophilus, A. viridis, A. viridochromogenus, A. hominis, A. innominatus* (con due tavole). (Dal Laboratorio Crittogamico Ital. di Pavia) . . . . . .

R. Ciferri e **P. Redaelli:** Segnalazione dello *Sporendonema epizoum* (Corda) Cif. et Red., su frutti di dattero in Libia. (Istit. Bot., Facoltà Agraria, R. Univ. di Firenze, ed Istit. di Anat. Patol., R. Univ. di Pavia) . . . . . .

L. Grigoraki: Le Docteur Sabouraud (1864—1938). (Laboratoire de Parasitologie de Marseille)

F. de Almeida: Study of a blackgrain mycetoma due to *Actinomyces paraguayensis* Almeida 1939, n. sp. (with two plates). (Faculdade Med., Universidade de S. Paulo, Brazil)

Isolamento di Schizomiceti cellulositici, Attinomiceti, Eumiceti dall' intestino delle Termiti e ricerche sulla attivita' cellulositica degli Attinomiceti

dei

Onorato Verona e Elio Baldacci.
(*Ist. di Microbiologia, R. Università di Pisa e R. Laboratorio Crittogamico di Pavia*)

Con tavola XX.

(10.II.1939.)

E' noto come in alcune Termiti (Famiglia Termitidae) sia presente una ricca flora e fauna microbica, localizzata particolarmente nei tratti dell'intestino posteriore (post-ventricolo, vestibolo, intestino largo, intestino cieco, colon, retto.) Questi microrganismi, studiati da varii AA. sono riferiti a specie di Protozoi, Schizomiceti ed Eumiceti; la loro presenza é stata oggetto d'indagine nei rapporti con il metabolismo di questi insetti.

Le nostre attuali ricerche intendono portare un contributo allo studio del metabolismo della cellulosa da parte delle Termiti, metabolismo che é effettuato solo in grazie della presenza della ricca flora microbica ricordata, ma vi è divergenza di vedute a quali microrganismi animali o vegetali sia attribuibile tale attività. Difatti Cleveland (6) e Dickman (8) pervenivano a resultati negativi circa la presenza di Schizomiceti cellulositici nell'intestino delle Termiti, mentre Beckwith e Rose (4) pur constatando una attività cellulositica nella flora batterica presente, non riuscivano ad isolare i microrganismi. Sulla scorta delle indagini di Cleveland, Trager (21) asseriva la presenza di una cellulasi secreta dai Protozoi simbionti delle Termiti. D'altro canto, la presenza di funghi del genere *Trichoderma*, nell'intestino delle Termiti, illustrati particolarmente dalla Hendee (11), e il nostro reperto di Attinomiceti (3) pure presenti nell'intestino delle Termiti, germi tutti ritenuti ad attività cellulositica, ponevano il problema in termini assai vasti ed interessanti.

Esponiamo in primo luogo le nostre ricerche; mentre nella discussione dei resultati diremo più particolarmente delle altrui, confrontandone gli esiti con quanto interessa al nostro riguardo.

Materiale e tecnica usata

Il materiale legnoso invaso da Termiti proviene dalla campagna Romana ed é costituito da tronchi di alberi. Le specie di Termiti presenti sono riferite a *Reticulitermes lucifugus* e *Calotermes flavicollis*. Ringraziamo il Prof. C. Jucci, direttore dell'Istituto di Zoologia della R. Università di Pavia, che ci forní detto materiale e determinò cortesemente le specie indicate. Altro materiale di studio fu costituito da detriti legnosi ed escrementizi di scaffalature invase da Termiti, proveniente da Biblioteche dell'Italia Meridionale, fornitoci dal Prof. A. Gallo, direttore del R. Istituto di Patologia del Libro, ed al quale vanno i nostri ringraziamenti.

Gli isolamenti sono stati effettuati insemenzando l'intero intestino posteriore, o

parte di esso, di insetti sia allo stato adulto, sia allo stato ninfale. L'intestino veniva estratto per stiramento dal ventre con ago sterile. Si procedé pure alla dissezione degli insetti e si insemenzò il contenuto dell'ampolla cecale a parte. Infine, si usò per le semine il liquido fuoriuscito dall'animale, grazie ad una leggera compressione esercitata su di esso e raccolto su vetrino portaggetti sterile. In tutti i casi si ebbe l'avvertenza di sterilizzare all'esterno le Termiti; immergendole rapidamente in una soluzione alcoolica di bicloruro mercurico al $2^0/_{00}$.

Si usarono i comuni terreni all'agar per gli isolamenti di Attinomiceti ed Eumiceti, mentre per la ricerca di cellulositici si fece uso della tecnica ideata da Winogradski (26) su piastre al silicogele, come l'unica oggi adatta per il sicuro accertamento ed isolamento di germi cellulositici.

Isolamenti e colture

Schizomiceti cellulositici. (fig. 1, 2, 3) Nelle piastre al silicogele allestite con la tecnica di Winogradsky, si ottenero colture riferibili al genere *Cytophaga*, e più raramente al genere *Cellvibrio*. Questi risultati sono costanti, sia con le varie modalità d'inoculo, sia con il vario materiale sopraelencato.

Per quanto riguarda l'isolamento dall'intestino delle Termiti occorre tuttavia avere l'avvertenza di procedere ad inoculi abbondanti di materiale, e ciò in armonia con quanto é noto sulla biologia di tali forme, le quali si mettono in evidenza molto bene seminando con dosi massive. Noi stessi dovemmo constatare un insuccesso nelle prime colture, effettuate con troppo scarso materiale.

E' opportuno segnalare che esiti positivi di colture di *Cytophaga* si ebbero pure anche con il legno attaccato dalle Termiti, e, ciò che ha ancora più importanza, con i boli fecali degli insetti. Le Termiti possono essere cosí i vettori dei germi cellulositici, nei riguardi dei danni che questi producono sui libri [Verona (22)] e poiché essi possono preesistere anche sulla carta [Verona (23)] un circolo di queste forme é possibile anche al di fuori del terreno. Ciò interessa particolarmente la conservazione dei libri nelle biblioteche.

Attinomiceti. Le colture furono ottenute con relativa facilità sui comuni terreni all'agar. [1]) Le forme isolate appartengono al genere *Actinomyces*, ed hanno il caratteristico odore di muffa assai netto. Mentre lo studio delle singole specie é rimandato alle ricerche che uno di noi [Baldacci (2)] sta svolgendo su questi germi, qui é opportuno dire che si tratta in prevalenza di ceppi di *Actinomyces albus*, *Actinomyces griseus*, *Actinomyceus violaceus*. Specialmente per queste due ultime specie la sistematica é assai confusa, moltissime essendo le specie con vegetazione aerea grigia o cinerea facenti capo a quello che molto impropriamente si chiama il gruppo del „griseus" o anche „scabies", mentre sono state descritte due o tre specie riferibili o simili alla prima descrizione di Rossi-Doria dell'*Act. violaceus*. Rimandiamo a questo proposito a quanto ha scritto uno di noi [Baldacci (1)].

Solo una specie, isolata a più riprese, si presenta con caratteristiche che non ci risultano finora descritte nella bibliografia di questi microorganismi. Essa presenta un micelio vegetativo di color nero ed un micelio aereo sporificato di color cacao. Non pigmenta il terreno mentre i colori delle colonie appaiono costanti. Produce spirali assai lunghe e

[1]) Formula usata: acqua 1000; peptone: 10 gr.; estratto di carne: 5 gr.; NaCl 5 gr.; agar 20 gr.; glicerina 10; pH = 7,0—7,2.

ben sporificate. Le colture tramandano debole odore di muffa. Anche questa specie sarà oggetto di nostre ricerche e pertanto la contrassegnamo per il momento come „*Actinomyces* sp. ceppo HA.".

Tutti i ceppi di attinomiceti isolati, che contrassegneremo nel contesto (vedi pag. 133) con sigle, furono coltivati su piastre al silicogele per lo studio della attività cellulositica.

Eumiceti: Le forme di Eumiceti isolati su terreni all'agar (terreno Pollacci) non presentano che scarso interesse, trattandosi di specie dei generi più diffusi, come *Penicillium, Scopulariopsis, Mucor, Alternaria, Dematium* ecc.

E' da rilevare il mancato isolamento di *Trichoderma*, che nelle ricerche già ricordate della Hendee (11) si dimostra, con i *Penicillium*, assai diffuso.

La presenza dei funghi nell'intestino delle Termiti non ha importanza, a nostro avviso, nel problema del metabolismo della cellulosa degli insetti o lo ha solo indirettamente. L'azione dei funghi e particolarmente del *Trichoderma*, che stando alle ricerche di Waksman (24), mostra una notevole attività cellulositica, si esplica sul legno ma allorché questo non é ancora ingerito dalle Termiti. Sui tronchi e sul legname in via di deterioramento lo sviluppo che possono prendervi i funghi é notevole, facilitato dalle condizioni ambientali di umidità (acqua piovana); e notevoli o almeno discrete possono essere le alterazioni prodotte e le decomposizioni. Ma l'azione dei funghi é fortemente ostacolata od addirittura impedita allorchè il legno é ingerito in piccoli frammenti dalle Termiti, sia dall'innalzamento del punto di acidità, che per le Termiti oscilla nei vari tratti dell'intestino fra pH = 5.0 e 6.8 [cfr. Kofoid (15)] e più secondo altri AA, mentre é noto come l'attività del *Trichoderma* e dei funghi si esplichi in mezzo molto acido, sia dalla rapidità di digestione delle Termiti, a cui si contrappone la lentezza dell'azione dei funghi. D'accordo quindi con i resultati ai quali sono arrivati vari AA., si può ritenere che i funghi hanno un ruolo nella dieta delle Termiti, per quanto riguarda le modificazioni che essi apportano nel legno prima che questo diventi cibo delle Termiti, e che essi vengano introdotti nell'intestino con il legno stesso costituendo una fonte di proteine e forse di vitamine [Hendee (11)]. Ciò concorda con la maggiore mortalità che si riscontra nelle Termiti allevate a dieta di cellulosa pura o sterilizzata. [Kofoid (15)].

Ricerche sulla attività cellulositica degli Attinomiceti

Nella bibliografia microbiologica gli Attinomiceti sono comunemente designati come germi ad attività cellulositica. Le prime affermazioni a questo riguardo risalgono al Krainsky (16) il quale isolò e descrisse varie specie di Attinomiceti dal terreno, e ne saggiò l'attività sulla cellulosa coltivandoli in soluzioni minerali contenenti frammenti di carta da filtro. A questo A. si deve infatti un *Actinomyces cellulosae* ed altre specie, come l'*Act. melanosporeus* e l'*Act. melonocyclus*, tutte ad asserita attività cellulositica. Uno di noi [Baldacci (2)] ha già avuto occasione di avanzare dubbi sulla vera entità di quest'ultima specie, ritenendo che le colture del Krainsky fossero contaminate da Batteri o da autentiche forme cellulositiche. Così l'*Act. melanosporeus* ristudiato da uno di noi [Baldacci (2)], mentre corrisponde nei caratteri morfocolturali alla descrizione di Krainsky, non manifesta, posto nelle stesse condizioni, alcun potere di attaccare la carta da filtro. Più tardi il Waksman (24) saggiò l'attività sulla cellulosa di alcuni Attinomiceti giungendo a concludere che questa é di gran lunga più debole di quella dei funghi (*Trichoderma* e *Aspergillus*) e della *Cytophaga Hutchinsonii*. Si noti che il metodo usato da questo A. é ancora quello della carta da filtro in soluzioni minerali.

Gli isolamenti effettuati da noi di germi cellulositici (*Cytophaga*) e di Attinomiceti ci riponeva nuovamente il problema della attività cellulositica di quest'ultini. Decidemmo pertanto di saggiare con il metodo di WINOGRADSKY, i ceppi di *Actinomyces* isolati dall'intestino delle Termiti, e di altri in nostro possesso, nonchè dell'*Actinomyces cellulosae* rimessoci cortesemente dal Centraalbureau voor Schimmelcultures di Baarn, che vivamente ringraziamo. Diamo qui a seguito l'elenco dei ceppi saggiati:

Actinomyces albus: ceppo M 1; ceppo O 5; ceppo O 3; ceppo Ba 1; ceppo O 6; ceppo C 13 R5; ceppo A P 1; ceppo O 2;

Actinomyces griseus. ceppo conservato nella Micoteca del R. Laboratorio Crittogamico.

Actinomyces sp. ceppo Lo 2;

A questi sono da aggiungere i ceppi isolati dalle Termiti e cioé:

Actinomyces albus, ceppo N.7R, isolato dall'intestino di *Reticulitermes lucifugus*.

Actinomyces albus, ceppo S, isolato da legno attaccato dalle Termiti.

Actinomyces griseus ceppo N.7R, isolato come il corrispondente *Act. albus*.

Actinomyces violaceus, ceppo N.1R, e N.3R; isolati dall'intestino di *Reticulitermes lucifugus*.

Actinomyces sp; ceppo a(C), e ceppo 4 A; isolati dall'intestino di *Calotermes flavicollis*.

Infine, l'*Actinomyces cellulosae*, di cui si é detto sopra e che costituisce un trapianto dell'originale di KRAINSKY. L'elenco qui riportato é fatto esclusivamente per designare i ceppi che saranno oggetto di ulteriori contribuzioni, a seguito di quelle effettuate da uno di noi, poiché agli effetti della ricerca sull'attività cellulositica tutti i ceppi hanno dato esito completamente negativo.

Le colture furono effettuate su piastre al silicogele, sopra le quali portammo del materiale, talora abbondante, per stimolarne la crescita, e proveniente da colture su agar. Coltivammo in termostato per oltre un mese ma senza resultato, come si é detto, non riuscendo ad ottenere un qualsiasi sviluppo. Altri saggi furono effettuati con il metodo indicato da KRAINSKY (16), coltivando su carta da filtro immersa in una soluzione minerale cosí costituita: K_2HPO_4: 0,1 gr.; $(NH_4)_3PO_4$: 0,5 gr.; acqua 1000. Non si ebbero resultati ad eccezione di un ceppo di *Act. albus*, della Micoteca del Laboratorio Crittogamico e del *Proactinomyces Lieskei* (Puntoni) Bald., i quali, pur sviluppando leggermente, non dimostrarono di intaccare la carta da filtro. In queste condizioni l'*Act. melanosporeus*, di nostro isolamento, lascia la carta leggermente corrosa, ma senza colorarla, come asserisce KRAINSKY. Non fu sperimentato l'*Act. cellulosae*.

Discussione dei risultati e conclusione

E' noto come nella generalità dei casi, il problema della cellulosa si risolve per mezzo di una correlazione funzionale tra animali e microrganismi, tra i quali sono da porsi in primo luogo gli Schizomiceti, la cui azione cellulositica é rapida e profonda. A questi si riferiscono, per quanto é stato finora segnalato, forme aerobiche ed anaerobiche. Fra quest'ultime é da porsi il *Bac. cellulosae dissolvens* isolato dall'intestino umano da Y. KHOUVINE (14); il *Bacillus cellulosam fermentans* descritto da E. WERNER (25), che lo isolò da larve di *Ptosia cuprea*; il *Pectridium cellulolyticum*, isolato da vari Ruminanti da POCHON (19). La specie isolata da KHOUVINE produce acido butirrico, quelle isolata da POCHON, acido formico, acetico, e in minore quantità propionico, e si discostano ambedue notevolmente dalle prime specie cellulositiche isolate e descritte da OMELIANSKY (20). Tra il gruppo degli aerobi rientrano le specie segnalate da WINOGRADSKY (26) appartenenti ai generi *Cytophaga, Cellvibrio, Cellfalcicula*, isolate dal terreno e suc-

Fig. 1

Fig. 2

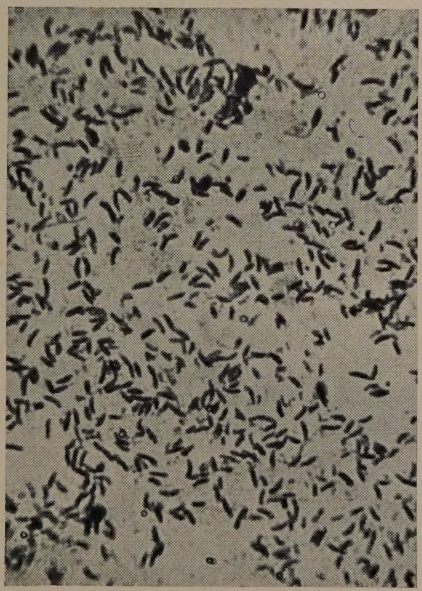

Fig. 3
Forme di schizomiceti cellulositici rinvenute nell'intestino delle Termiti.

cessivamente ritrovate da vari AA. nel letame, nel rumine e nelle feci dei bovini e in mezzi diversi: numerosi sono gli studi sulla digestione xilofaga degli insetti a mezzo di batteri simbionti, ma riteniamo qui inutile soffermarvici.

Nelle Termiti la ricerca di germi cellulositici fu effettuata negativamente da Cleveland (6) e da Dickman (8). Il Cleveland non fece uso delle tecnica di Winogradsky, e, rilevando la presenza di frammenti di legno nell'interno dei Protozoi, come era già stato osservato dai nostri Grassi (9-19) Buscalioni e Comes (5), finí con l'attribuire il compito di digerire la cellulosa ai Protozoi.

Dickman più tardi riusciva e constatare la presenza di Batteri cellulositici, nel legno attaccato dalla Termiti, con la coltura su piastre al silicogele, ma poiché tale ricerca era negativa con le semine di liquido e con porzioni dell'intestino degli insetti, l'A. concludeva negativamente nei riguardi dell'importanza di questi germi nella digestione della cellulosa da parte delle Termiti. Prima di questo A., Beckvith e Rose (4) erano riusciti a mettere in evidenza una attività cellulositica dovuta a Batteri su colture fatte su soluzioni minerali e carta da filtro. Questa attività era manifesta in 11 saggi su 85 eseguiti in condizioni di aerobiosi. Tuttavia i tentativi per isolare e coltivare i microrganismi fallirono tutti; come pure le colture poste in condizioni anaerobiche non manifestavano attività cellulositiche. Le osservazioni al microscopio permettevano ai due AA. di asserire che la flora cellulositica era costituita da forme a bastoncino gramnegative e da micrococchi, e che erano da escludere le Spirochete e i Protozoi. Dickmann, già ricordato, impugnava questi resultati criticando il metodo di sterilizzazione all'esterno delle Termiti, eseguito con tintura di iodio (U.S.P.) per 45 secondi. La breve esposizione e il formarsi di bollicine d'aria durante l'immersione, non era sufficiente, al dire del Dickmann, a sterilizzare sicuramente l'esterno delle Termiti, nelle quali si sarebbero trovati presenti i Batteri cellulositici, provenienti dal legno.

A nostro avviso il difetto delle esperienze di Beckvith e Rose, sta nell'aver fatto uso di una tecnica insufficiente per mettere in evidenza le forme cellulositiche, quando oramai gli studi di Winogradsky dimostravano la superiorità e la completezza del metodo da lui stesso ideato. Che se poi l'osservazione di Dickman fosse nel giusto, circa l'insufficiente sterilizzazione esterna delle Termiti, le colture avrebbero dovuto dare più facili e più abbondanti saggi positivi, data la grande presenza di germi cellulositici all'esterno delle Termiti.

Le nostre ricerche dimostrano oramai indiscutibilmente la presenza di questi microrganismi nell'intestino delle Termiti e nei loro escrementi, e ci fanno concludere che anche in questo caso la correlazione funzionale nella digestione della cellulosa si esplica attraverso la simbiosi degli Schizomiceti cellulositici.

Questi resultati appaiono in contrasto con alcune ricerche di Cleveland (6) e con quelle di altri AA. che alle ricerche di Cleveland si ispirarono. Vale quindi la pena di esaminarle attentamente.

Cleveland (6) in una serie di lavori dimostrava che é possibile defaunare le Termiti con vari accorgimenti e che le Termiti così defaunate muoiono, dopo 10—20 giorni, per incapacità di digerire la cellulosa. La vita é, difatti, prolungata o addirittura ne è scongiurata la morte, se si alimentano le Termiti defaunate con zuccheri come era stato sperimentato già da Montalenti (17) o se si somministra legno attaccato da funghi, Attinomiceti e Batteri, aventi, cioè, la cellulosa in qualche modo già degradata. Altre osservazioni collaterali inducono l'A. a concludere che é probabile, se non certo, che le Termiti dipendono dai Protozoi per la digestione del legno. Tali considerazioni erano rafforzate dall'esito negativo delle ricerche intraprese dall' A. stesso nei riguardi dell'isola-

mento di Schizomiceti e Funghi cellulositici dall'intestino delle Termiti. Ulteriori lavori illustrano il metodo di cattura da parte dei Protozoi intestinali, delle particelle di legno e la possibilità di mantenere in vita le Termiti, con i Protozoi simbionti, a mezzo di una dieta di pura cellulosa. Infine, in un ultimo lavoro, l'A., svolgendo altre considerazioni sulla simbiosi fra Termiti e Protozoi, é indotto ad accettare la possibilità che le Spirochete delle Termiti, aderenti ai flagelli dei Protozoi, abbiano un ruolo nelle digestione della cellulosa, sulla scorta dei lavori di Holland (12) e di Damon (7). In un „addendum" al lavoro stesso per altro Cleveland asserisce di aver potuto allontanare le Spirochete dall'intestino delle Termiti e di aver potuto mantenere in vita le Termiti stesse. Ciò dimostrerebbe a detta dell'A., la scarsa importanza di queste forme e la predominante azione dei Protozoi nella digestione della cellulosa.

Sulla scorta dei lavori del Cleveland, Trager (21) effettuò nuove ricerche. In un primo lavoro riferisce sull'isolamento di una cellulasi complessa (cellulasi e cellobiasi) dai Flagellati simbionti delle Termiti e del *Cryptocercus punctulatus*. In un secondo lavoro é precisato, circa le Termiti, come sia riuscito ad effettuare la coltura di *Tricomonas termopsidis*, da *Termopsidis angusticollis*, e di *Trichomonas* sp. da *Reticulitermes flavipes* e *Tricercomitus termopsidis* da *Termopsis angusticollis*. Di questi microrganismi solo il primo possiede una attività cellulositica.

Tuttavia l'impossibilità di ottenere questo Protozoo libero da Batteri nelle colture, pone una riserva agli esiti ottenuti dall'A. Difatti, se nel primo lavoro egli scriveva che tali Batteri saggiati sulla cellulosa (ma non con il metodo di Winogradsky) si mostravano incapaci di attaccarla mentre fermentavano il glucosio, nel lavoro successivo é precisato che la coltura del *Trichomonas termopsidis* era ottenuta solo usando cellulosa e che lo sviluppo del Flagellato non si aveva se questa era sostituita con cellobiasi, amido, destrina, inulina, glicogeno, agar, cellulosa triacetata, cellobiasi ottoacetata. Sotto questo rispetto, scrive lo stesso A., il Protozoo si mostra più vicino a certi Batteri cellulositici del tipo *Cytophaga*.

A questo punto ci soccorrono le ricerche di Pierantoni (18). Questo A. mette in luce per primo con ricerche citologiche la presenza di simbionti endocellulari nei Flagellati delle Termiti, particolarmente delle specie *Reticulitermes lucifugus* e *Calotermes flavicollis*, che sono le due specie più frequenti in Italia. Tali simbionti sono riferiti a Batteri e sono facilmente isolabili e coltivabili, a detta dell'A., il quale ritiene che a mezzo di questi, i Flagellati effettuino la decomposizione della cellulosa del legno ingerito. Nel *Calotermes*, inoltre il Pierantoni, mette in evidenza uno strato batterico aderente alle pareti dell'ampolla cecale. Con la defaunazione, tale strato tende ad aumentare e rendersi maggiormente visibile. Questi fatti acquisiti dall'A. trovano nelle nostre ricerche una riprova la quale potrà essere maggiore e, forse, definitiva se si potramo saggiare queste forme isolate sulle piastre al silicogele. Difatti é evidente come un esito positivo delle colture di Batteri del corpo del Flagellato e dello strato epiteliale dell'ampolla cecale, con il metodo di Winogradsky, potrà portare in luce la vera natura di questi germi.

La simbiosi tra Flagellati e cellulositi spiegerebbe i resultati di Trager detti sopra, e quelli di Cleveland, sulla morte per defaunazione delle Termiti. Allo stato dei fatti essa appare tutt'altro che improbabile. Che poi la simbiosi possa effettuarsi anche o parzialmente direttamente fra Termitidi e Batteri risulta, oltre che dalle citate ricerche di Pierantoni, da quelle di Jucci (13) sulla presenza di batteriociti nel *Mastotermes*, analogamente a quanto si riscontra nei Blattidi. Questo A. esclude peraltro la presenza di batteriociti nel *Termes lucifugus* e nel *Calotermes flavicollis*.

Volendo riepilogare e schematizzare, la nutrizione idrocarbonata delle Termiti

sarebbe effettuata attraverso queste fasi: *a*) ingestione del legno da parte delle Termiti e cessione parziale ai Protozoi; *b*) degradazione della cellulosa del legno da parte dei Batteri aderenti alle pareti intestinali (ampolla cecale); *c*) degradazione da parte dei simbionti dei Flagellati; *d*) cessione dei prodotti degradati alle Termiti attraverso l'assorbimento intestinale e la protozoofagia. Le fasi di cui in *b*) e *c*) sebbene assai probabili richiedono, come si é detto, una riprova colturale per la definitiva accettazione. Solo se questo controllo fosse negativo, allora si potrebbe accettare l'ipotesi che, in effetti, alcuni Protozoi possano attaccare la cellulosa e vivere alla stregua degli Schizomiceti cellulositici.

Per quanto riguarda gli esiti delle ricerche sulla attività cellulositica degli Attinomiceti, si deve osservare che esse trovano conferma nelle osservazioni di Winogradsky (26). Questo A. aveva già rilevato come negli isolamenti su piastre allestiti secondo la sua tecnica non sviluppassero Attinomiceti, i quali invece vi crescevano se si aveva cura di aggiungere alle piastre al silicogele materia umica. Poiché questi germi erano gli unici a sviluppare in queste condizioni, se si eccettuano alcune forme batteriche particolari, Winogradsky ne deduceva che „les actinomycètes s'accommodent des matières humiques comme seul aliment, lesquelles sont à considérer comme le résidu des actions microbiennes sur la substance des végétaux. Ces organismes se contentent donc du rebut des autres, et cette conclusion s'accorde bien avec le fait du développement extrêmement lent qui leur est propre et qui les met en état d'infériorité évidente dans toutes les compétitions autour de la matière énergétique." Se quindi in Natura gli Attinomiceti esplicano una qualche azione sulla cellulosa, essa si esercita forse sulle fasi ulteriori (ad es. emicellulose). In ogni modo é da escludere un loro intervento a favore delle Termiti nell'intestino delle Termiti stesse.

Riassunto

Gli AA. sono riusciti ad isolare, per la prima volta, Schizomiceti cellulositici del genere *Cytophaga* ed Attinomiceti del genere *Actinomyces*, dall'intestino delle Termiti. Sono altresí isolate alcune specie fungine, come era già noto. Gli Attinomiceti isolati non dimostrano di possedere capacità di attaccare la cellulosa, analogamente a quanto accade per altri ceppi di diversa provenienza degli stessi microrganismi.

Gli AA. confrontano e discutono i loro resultati con quelli di altri AA. tendenti ad attribuire ai Protozoi simbionti delle Termiti una attività cellulositica, che ad essi non sembra sufficientemente provata. Gli AA. ritengono che tale attività si debba, invece, attribuire ai Batteri simbionti dei Protozoi e a quelli aderenti alle pareti dell'intestino delle Termiti stesse.

Summary

From the intestinal apparatus of the Termites were isolated, for the first time, cellulositic bacteria of the genus *Cytophaga*, in addition to ray-fungi of the genus *Actinomyces* and species of true fungi previously known. The cellulositic activity of *Actinomyces* has not been, instead, experimentally demostrated.

The results obtained are discussed in relation to the presumed cellulositic activity of Protozoa symbiotic of the Termite ants.

Bibliografia

(1) Baldacci, E., Boll. Sez. Ital. Soc. Int. Microbiologia, **5**, maggio (1937); (2) Baldacci, E., Atti Ist. Bot. Pavia, serie IV, **10**, 321—329, (1938); Mycopathologia **1**, 271—272, (1938); (3) Baldacci, E., Boll. Soc. Ital. Biologia Sper., **13**, 1187—1188, (1938) — (4) Beckwith, T. D. e Rose, E. J., Proc. Soc. Exper. Biol. Med., **27**, 1, (1929) — (5) Buscalioni, L. e Comes, S., Atti Accad. Gioenia Sci. Nat., Catania, s: V, **3**, 1—15, (1910) — (6) Cleveland, L. R., Biol. Bull. XLVI, 178—201, 203—227, (1924); ibidem XLVIII, 282—288, 289—293, 295—208, 309—326, (1925); ibidem LIV, 231—237, (1928) — (7) Damon, S. R., Journal. Bact., **11**, 31—36, (1926) — (8) Dickmann, A., Biol. Bull. **61**, 85—92, (1931) — (9) Grassi, B., Mem. R. Accad. Lincei, **12**, (5) — (10) Grassi, B., e Foa, A., Rend. Acc. Lincei, **18**. — (11) Hendee, E. C., Science, n.s., **77**, 212, (1933); **80**, 316, (1934) e Hilgardia **9**, 499, (1935) — (12) Hollande, A. C., Arch. Zool. Exper. et Gen., Notes et Revue. **61**, 23—28, (1922) — (13) Jucci, C., Mem. R. Acad. Lincei, **14**. (5), 1—235, (1923) — (14) Khouvine, Y., C. R. Soc. Biol., **94**, (1926) — (15) Kofoid, C. A. ecc., Termites and termite control, (Berchley) (1934) — (16) Krainsky, A., Centralb. f, Bakt., II Abt., **41**, 649—688, (1914) — (17) Montalenti, G., Rend. R. Acc. Lincei, **6**, (6), (1927) — (18) Pierantoni, U., Arch. Zool. Ital. **22**, 135—173, (1936) — (19) Pochon, J., Ann. Ist. Pasteur, **55**, (1935); C. R. Acad. de Scienc., 202, (1936); C. R. Soc. Biol. **125**, (1937), id. **126**, (1937), id. **127**, (1938) — (20) Omeliansky, V., C. R. Ac. de Scienc., **121**, 653, (1895); Centr. Bakt., II Abt., **8**, 193, (1902); **11**, 369, (1903), **12**, 33, (1904) — (21) Trager, W., Biochem. Jour., **26**, 1762, (1932); Biol. Bull. **46**, 182—190, (1934) — (22) Verona, O., Accademie e Biblioteche d'Italia, anno XI, (1937) — (23) Verona, O., Bull. Soc. Int. Microbiologia (Sez. Ital.), **10**, 91—92, (1938) — (24) Waksman, S. A., Principles of soil microbiology, (1932) — (25) Werner, E., Centr. Bakt., II Abt., **67**, 297—330, (1926) — (26) Winogradsky, S., Ann. Ist. Pasteur, **39**, 348, (1925); **43**, 559, (1929); **48**, 91, (1932) —

DR. W. JUNK — THE HAGUE

DIE MIKROSKOPISCHEN BODEN-PILZE

Ihr Leben, ihre Verbreitung sowie ihre oeconomische und pathogene Bedeutung

von

Anneliese Niethammer

V u. 193 p. mit 6 Tafeln u. 57 Text-Abbildungen. Preis fl 13.—, in Halb-Saffianband gebunden fl 17.—

Inhalt: Einleitung (Nachweis des Lebens sowie der Leistungen mikroskopischer Pilze im Boden. Versuch einer Erklärung des Begriffes „Mikroskopische Pilze" des Bodens. Bedeutung und Verbreitung der mikroskopischen Pilze im Boden. Ungelöste Probleme, sowie Aufgaben kommender Forschung. Methodische Hinweise). Systematische Übersicht der Pilz-Formen (Phycomycetes, Eumycetes, Fungi imperfecti). Verbreitungs-Gebiete. Kreislauf der Pilze in der Natur. Pathologie. Leistungen. Wachstums-Regulatoren. Düngungs-Fragen. Ausblick. Literatur.

This book is devoted to quite a new subject viz. to the knowledge of the microscopic fungi, which are found in the soil. For the first time is given in this work the description and illustration of all species (about 400) of the whole earth and of their geographical distribution. A number of them is new. The work is highly important not only for mycologists but also for the students of the biology and pathology of plants and chiefly for those interested in agriculture and forestry. It will form the basis of a new branch of science.

DAS INTERNATIONALE ORGAN DER FERMENT-FORSCHUNG

„ENZYMOLOGIA"

Redaction: C. OPPENHEIMER

publiciert

aus den Instituten von über 100 Collaboratores

DIE NEUESTEN FORSCHUNGS-ERGEBNISSE

*

Bisher erschienen: Vol. I—VI — Preis pro Vol. fl. 15.—

Prospecte stehen zur Verfügung!

BIOLOGICAL OXIDATION

by

C. Oppenheimer and **K. G. Stern**

1939. 327 pages. Cloth. Price fl. 15.—

Table of Contents:

I: Theories of Oxido-Reduction (General part. Extension and remodeling of previous theories. Theory of chain reactions). — II: Forms of Oxidative Catalyses (Energetics and potentials. Catalysis of oxido-reduction. Oxidative Catalysis via Peroxides).—III: The Enzyme System (Theoretical fundaments. Descriptivechemistry of enzyme systems). — IV: General biological significance of Desmolysis. — V: Cell Respiration (Main respiration and residual respiration. The intermediary catalysts).

The book — the authors of which are the well known professors C. O. of Berlin and K. G. S. of Yale University of New Haven — attempts to summarize in moderate space our present knowledge of biological oxidation. Though there exist a few recent review articles and small monographs on certain aspects of this subject there is no treatment available of comparable completeness and comprehensiveness. Since C. Oppenheimer wrote his „Die Fermente" in 1926, our knowledge in this field has advanced in strides rendering reviews appearing before 1930 obsolete. A glance over the bibliography appended to the book makes it evident that by far the larger part of information on biological oxidation and cell respiration has been gathered within the last few years. Discoveries of far reaching importance have been made: The yellow oxidation enzyme and the flavins, the constitution of hemin containing enzymes and of certain fermentation enzymes and co-enzymes, ascorbic acid, carrier systems, are only a few examples. In addition, almost innumerable facts concerning the previously known catalysts of desmolysis have been collected. It is the ambitious aim of this book to coordinate all these results and to give the essential facts in condensed form. There are tables provided listing the oxidation-reduction potentials of biologically important systems and the absorption maxima of hemin catalysts. The extensive bibliography — over 1400 quotations — is arranged in alphabetical order and covers the literature up to and including 1938.

The monograph is of special importance to the biochemist, the physiologist and the pharmacologist. The topic should appeal to every student of living matter, whether he works in the realm of medicine, biology or the more abstract natural sciences. The chemist will recognize in the subject a special aspect of a phenomenon of fundamental importance to his science, namely of catalysis. The book will serve the newcomer and the seasoned investigator equally well. To follow the arguments and to understand the exposition, hardly more than an elementary knowledge of chemistry and physical chemistry is required.

UITGEVERIJ Dr. W. JUNK
87 VAN BLEISWIJKSTRAAT
DEN HAAG (Holland)